บทที่2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงาน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

1.1 เรือสำรวจ ได้แก่เรือสำรวจประมง 1 และ 2 ของกรมประมง

1.2 เครื่องมืออวนลากหน้าดินแบบมีแผ่นตะเฆ่ (otterboard trawl)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 Waring blender สำหรับบดปลาให้ละเอียด

2.2 กระจกนาฬิกา สำหรับใส่ส่วนต่างๆของปลาเพื่อนำไปอบ

2.3 ตู้อบ, เครื่องชั่งชนิดละเอียด, aluminum foil , ไม้บรรทัด

2.4 Erlenmeyer flask 500 ml สำหรับใช้ในการ digest

2.5 Hot plate สำหรับใช้ digest

2.6 ขวดพลาสติก (polyethylene)ขนาด 100 ml สำหรับใส่ตัวอย่างที่ digest แล้ว

2.7 เตาไฟฟ้าสำหรับย่อยตะกอนด้วยกรด

2.8 Atomic absorption spectrophotometer

3. สารเคมีที่ใช้

3.1 กรดไนตริก (HNO_3) ชนิดที่เป็น AR grade และ re-distilled

3.2 Stock solution ของโลหะแคดเมี่ยม, ทองแดง, ตะกั่ว, สังกะสี, แมงกานีสและนิเกิล

3.3 Standard solution ของโลหะแต่ละชนิดดังกล่าวแล้ว

วิธีดำเนินงาน

1. การกำหนดบริเวณ

การเก็บตัวอย่างในการทำวิจัยนี้เป็นตัวอย่างซึ่งได้จากการสำรวจเกี่ยวกับน้ำเสียในบริเวณอ่าวไทยตอนในสุด โดยแบ่งออกเป็น 4 บริเวณใหญ่ๆ (A, B, C, D) และใช้เส้น Lat 13° 00' 00" N และ Long 100° 30' 00" E เป็นเส้นแบ่งดังแสดงในแผนที่รูปที่ 1

2. การเก็บตัวอย่าง

เนื่องจากมีข้อขัดข้องบางประการเกี่ยวกับเรือที่จะใช้ในการสำรวจ ดังนั้นการเก็บตัวอย่างจึงทำได้เพียง 3 ระยะคือ

ระยะที่ 1 เดือนมีนาคม 2519

ระยะที่ 2 เดือนพฤษภาคม 2519

ระยะที่ 3 เดือนกันยายน 2519

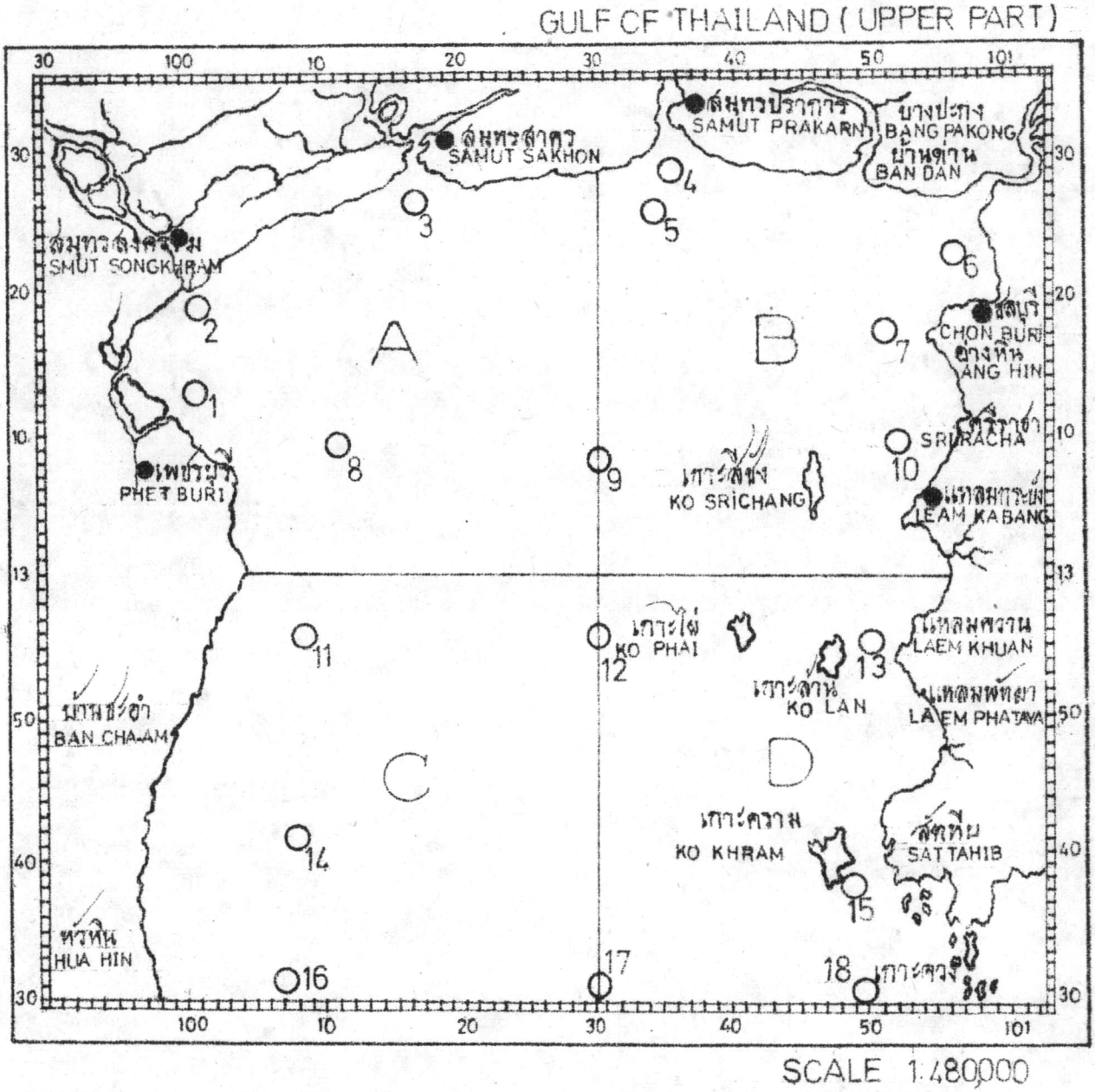
3. การเตรียม stock solution ของโลหะแต่ละชนิด

โลหะแคดเมี่ยม

ชั่งโลหะแคดเมี่ยมบริสุทธิ์ 0.100 กรัม ละลายในสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 5 ml ทำให้ร้อนเพื่อช่วยการละลาย ทำให้มีปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น stock cadmium นี้จะมีความเข้มข้น 100 ppm Cd

โลหะทองแดง

ชั่งลวดทองแดงบริสุทธิ์ 1.000 กรัมใส่ลงใน beaker 1 ลิตร เติมกรดไนตริก (1 + 1) ลงไป 10 ml และน้ำกลั่นเล็กน้อย เมื่อปฏิกริยาหยุดแล้วค่อยๆอุ่นสารละลายใน beaker ทิ้งไว้ให้เย็น ทำให้มีปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น stock copper นี้จะมีความเข้มข้น 1000 ppm Cu



รูปที่ 1 บริเวณทำการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำในอ่าวไทยตอนบน

โลหะตะกั่ว

ละลาย 1.599 กรัม anhydrous lead nitrate $Pb(NO_3)_2$ ในน้ำกลั่น เติม 10 ml กรดไนตริกเข้มข้น dilute เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น stock lead นี้จะมีความเข้มข้น 1000 ppm Pb

โลหะแมงกานีส

ละลาย 2.747 กรัม manganese sulphate $MnSO_4$ (ซึ่งอบให้แห้งที่อุณหภูมิ $180^{\circ}C$ เป็นเวลา 1 วัน) ด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตร 1 ลิตร สารละลายนี้เข้มข้น 1000 ppm Mn

โลหะนิเกิล

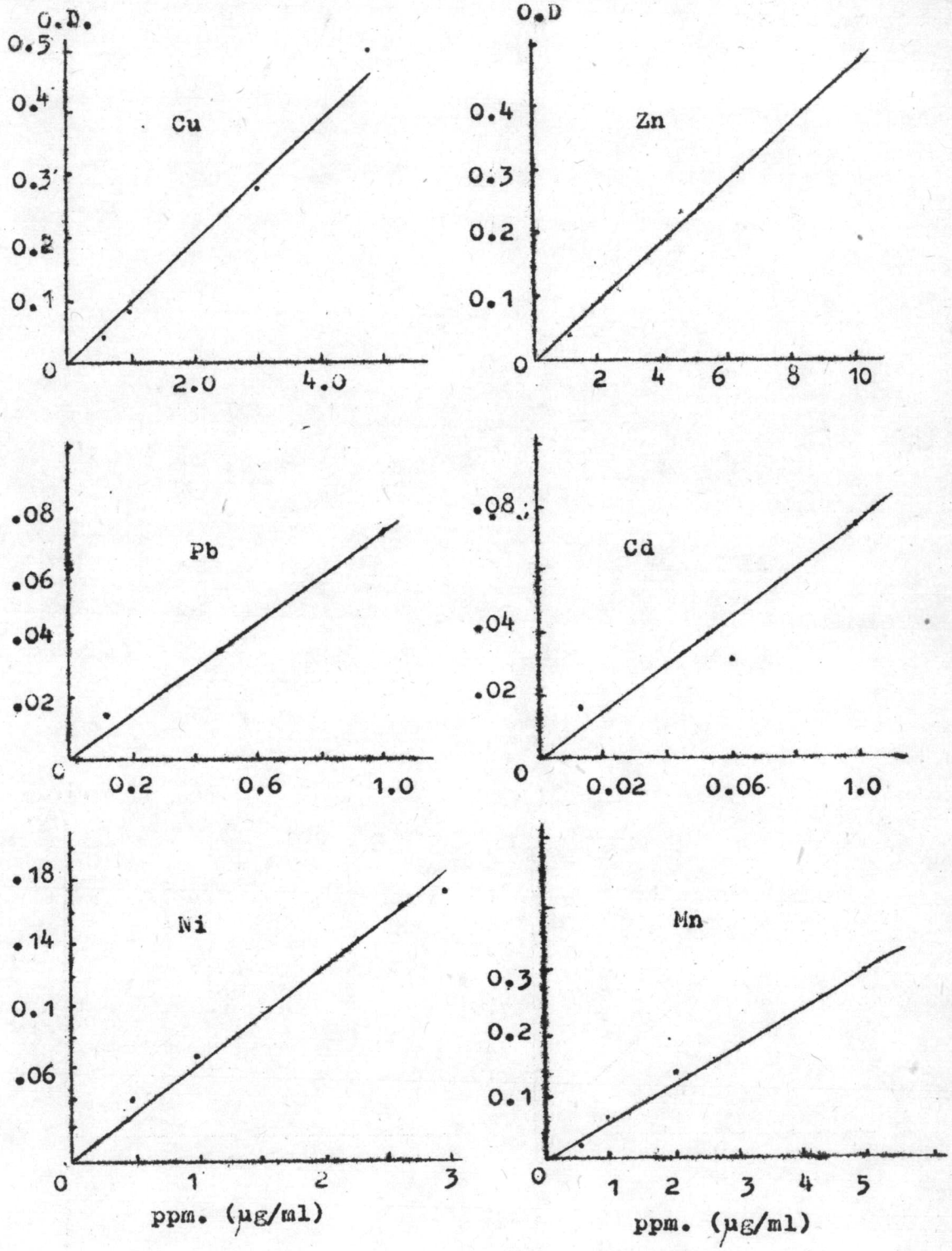
ละลาย 0.4479 กรัม nickel sulphate $NiSO_4.6H_2O$ ในน้ำกลั่นและทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตร ได้สารละลายเข้มข้น 100 ppm Ni

โลหะสังกะสี

ชั่งโลหะสังกะสี 1.000 กรัม ละลายในกรดไนตริกเข้มข้น 10 ml ทำให้มีปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น ได้สารละลายเข้มข้น 1000 ppm Zn

4. การเตรียม standard solution

จาก stock solution ดังกล่าวแล้วนำมาเตรียม standard solution ให้มีความเข้มข้นต่างๆกันเช่น 1, 3, 5, 10 ppm โดยใช้สารละลายกรดไนตริกซึ่งมี pH ใกล้เคียงกับตัวอย่างมา dilute เพื่อนำไปทำ calibration curve ดังแสดงในรูปที่ 2 - 7



รูปที่ 2. Calibration curve ของโลหะชนิดต่างๆ

5. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างมา classify ชนิด วัดความยาว แล่เนื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่น ห่อด้วย aluminum foil ส่วนอวัยวะภายในเช่น ตับ, อวัยวะสืบพันธุ์, ระบบทางเดินอาหารอื่นๆ แยกออกจากกันและห่อด้วย aluminum foil แล้วจึงนำไปแช่แข็งไว้เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์ต่อไป

6. การวิเคราะห์

6.1 ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 15 กรัม บดให้ละเอียดแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 60°C นานประมาณ 24 ชั่วโมง

6.2 นำตัวอย่างซึ่งแห้งดีแล้วมาชั่งด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ให้ได้น้ำหนัก 4.000 กรัม แต่ถ้าตัวอย่างไม่เพียงพอก็อาจลดจำนวนลงได้แต่ต้องเป็นน้ำหนักที่ละเอียดเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณ

6.3 ใส่ตัวอย่างที่ชั่งเรียบร้อยแล้วลงใน Erlenmeyer flask

6.4 เติมกรดไนตริกลงไปประมาณ 5 - 10 mlปิดฝาด้วย silica bulb stopper ทิ้งไว้ 1 คืนที่อุณหภูมิห้อง

6.5 นำตัวอย่างมาเติมกรดไนตริกอีกประมาณ 10 ml นำไปตั้งบน hot plate ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 140°C

6.6 ปล่อยให้ตัวอย่างทำปฏิกริยากับกรดไนตริกจนกระทั่งไม่มีควันสีน้ำตาล (ประมาณ 3 วัน) หรือจนแน่ใจว่าสารอินทรีย์ถูก oxidise จนหมด ถ้ายังมีสารอินทรีย์เหลืออยู่ให้เติมกรดไนตริกลงไปอีก 5 ml ปล่อยให้ทำปฏิกริยาต่อไปอีก

6.7 เปิด stopper ออกแล้วปล่อยทิ้งไว้บน hot plate ให้ระเหยอย่างช้าๆจนแห้ง

6.8 ยกตัวอย่างลง เติมกรดไนตริกลงไปตัวอย่างละ 2 ml แล้วเติมน้ำลงไป 25 ml จึงนำไปต้มจนสิ่งที่เหลืออยู่ละลายไปหมด

6.9 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ทำให้มีปริมาตรเป็น 50 ml ด้วยน้ำกลั่น

6.10 เก็บตัวอย่างนี้ไว้ในขวดพลาสติก (polyethylene) นำไปวัดด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer

7. การทำ Recovery

เพื่อแสดงว่าวิธีที่นำมาใช้นี้ได้ผลออกมามากน้อยเพียงไร

วิธีการทำ recovery ของตัวอย่าง

1. นำตัวอย่างมา 1 ตัวอย่าง

2. แต่ละตัวอย่างนำมาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนๆละ 4.0 กรัมเท่าๆกัน ตัวอย่างส่วนแรกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะแต่ละชนิดตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว

3. ตัวอย่างอีก 2 ส่วนนำมาเติม standard ซึ่งทราบปริมาณความเข้มข้นอย่างแน่นอนแล้ว จึงนำไปวิเคราะห์ตามวิธีดังกล่าวมาแล้วเช่นกัน

8. การทำ Precision

จุดประสงค์เพื่อดูว่าภายใต้สภาวะการทดลองที่เหมือนกันทุกประการ จะมีการกระจายของผลที่ได้มากน้อยเพียงไร

วิธีการทำ precision

1. นำตัวอย่างมา 1 ตัวอย่าง

2. แบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 ส่วนๆละ4.0 กรัมเท่าๆกัน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะตามวิธีดังกล่าวมาแล้ว

9. การคำนวณผล

9.1 การหาปริมาณของโลหะเป็น ppm ในตัวอย่าง

จาก standard solution นำมาทำเป็น calibration - curve แล้วนำค่า optical density ของตัวอย่างที่วัดได้มาหาเป็นปริมาณ

โดยเทียบกับ calibration curve

สมมุติให้ค่าจากกราฟของโลหะทองแดงอ่านได้ x µg/ml

ดังนั้นตัวอย่าง 50 ml มีทองแดงอยู่ 50 x µg

แต่ตัวอย่าง 50 ml มาจาก dry weight 4 กรัม

นั่นคือตัวอย่าง 4 กรัมมีโลหะทองแดงอยู่ 50 x µg

" " 1 " " 50 x/4 "

ดังนั้นตัวอย่างนี้มีโลหะทองแดงอยู่ $\frac{50\ x}{4}$ ppm (µg/g)

9.2 การหาเปอร์เซนต์ Recovery

สมมุติค่าจากกราฟของโลหะทองแดงในตัวอย่างที่ไม่ได้เติม standard อ่านได้ x µg/ml

สมมุติค่าจากกราฟของโลหะทองแดงในตัวอย่างที่เติม standard 1 ppm อ่านได้ y µg/ml

นั่นคือถ้า y - x มีค่า 1 ppm แสดงว่า recovery = 100 %

" " m " " = 100m %

9.3 การหา precision

โดยใช้ความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) เป็นตัววัดการกระจายของข้อมูล

จากสูตร S.D. = $\sigma = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N}}$

โดยที่ $\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \ldots\ldots + X_N}{N}$

$X_1, X_2, \ldots X_N$ = ค่าของโลหะที่หาได้ในตัวอย่างแต่ละส่วน

N = จำนวนส่วนทั้งหมดที่ถูกแบ่งออก

9.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

9.4.1 การหาค่าเฉลี่ย

ก. ค่าเฉลี่ยของโลหะซึ่งสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของปลาหรือสัตว์น้ำชนิดอื่นๆมีค่าบางค่าซึ่งแตกต่างไปจากค่าส่วนใหญ่มาก เมื่อนำมาเฉลี่ยโดยใช้มัชฌิมเลขคณิต ค่าเฉลี่ยที่ได้จะผิดไปจากข้อเท็จจริงมาก ดังนั้นจึงใช้มัชฌิมเรขาคณิตเป็นค่าเฉลี่ยสำหรับข้อมูลที่ได้เมื่อข้อมูลแต่ละค่าไม่มีค่าใดเป็นศูนย์ และค่าเฉลี่ยที่ได้ก็จะใกล้เคียงกับค่าส่วนใหญ่ โดยใช้สูตร

$$G.M. = \sqrt[N]{X_1 . X_2 \ldots\ldots X_N}$$

หรือ $$\log G.M. = \frac{1}{N} (\log X_1 + \log X_2 + \ldots + \log X_N)$$

$$= \frac{\log X}{N}$$

$G.M.$ = มัชฌิมเรขาคณิตของปริมาณโลหะแต่ละชนิด

$X_1, X_2, \ldots X_N$ = ปริมาณโลหะในแต่ละตัวอย่าง

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ข. ค่าเฉลี่ยของโลหะแต่ละชนิดในเนื้อปลาในแต่ละเดือนในบริเวณต่างๆเพื่อนำมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติ คำนวณจากสูตร

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{N}$$

$\bar{X}$ = ค่าเฉลี่ยของปริมาณโลหะแต่ละชนิด

$\sum X$ = ผลรวมของปริมาณโลหะ

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

9.4.2. หาความเบี่ยงเบนมาตราฐาน

คำนวณจากสูตรที่แสดงไว้ใน 9.3

9.4.3 <u>ทดสอบความแตกต่างของปริมาณโลหะในกล้ามเนื้อปลาในแต่ละบริเวณ</u>

ใช้หลักการวิเคราะห์วาเรียนซ์ (Analysis of variance or F - test) (Snedecor,1956) เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณโลหะแต่ละชนิดในกล้ามเนื้อของปลาในแต่ละบริเวณ โดยตั้งสมมติฐานว่า ค่าเฉลี่ยของโลหะชนิดนั้นๆ ในแต่ละบริเวณ (A, B, C, D) มีค่าไม่แตกต่างกัน

$$H_o : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

μ = ค่าเฉลี่ยของโลหะชนิดนั้นๆในแต่ละบริเวณ

$$F = \frac{\text{Mean squares ระหว่างบริเวณ}}{\text{Mean squares ในบริเวณเดียวกัน}}$$

ถ้าค่า F ที่คำนวณได้น้อยกว่าค่าจากตารางที่ degree of freedom เดียวกัน จึงยอมรับสมมติฐานที่ตั้งขึ้น แต่ถ้าค่า F ที่คำนวณได้มากกว่าค่าจากตารางจะไม่ยอมรับสมมติฐานที่ตั้งขึ้น หมายความว่าค่าเฉลี่ยของโลหะชนิดนั้นๆในแต่ละบริเวณแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

9.4.4 <u>ทดสอบความแตกต่างของปริมาณโลหะซึ่งสะสมในกล้ามเนื้อปลาหน้าดิน (demersal fish) กับปลาผิวน้ำ (pelagic fish)ซึ่งจับได้ในเดือนมีนาคม, พฤษภาคมและกันยายน</u>

ใช้ Student's t- test เพื่อทดสอบความแตกต่างของโลหะแต่ละชนิดระหว่างปลาหน้าดินและปลาผิวน้ำ โดยตั้งสมมติฐานว่า ค่าเฉลี่ยของโลหะนั้นๆ ระหว่างปลาหน้าดินและปลาผิวน้ำมีค่าไม่แตกต่างกัน โดยใช้สูตร

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{(Snedecor, 1956)}$$

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มากกว่าค่า t จากตารางที่มี degree of freedom เท่ากัน จะไม่ยอมรับสมมติฐานนี้ แต่ถ้าค่า t ที่คำนวณได้มีค่าน้อยกว่าค่า t จากตารางจึงยอมรับสมมติฐานนี้ นั่นคือค่าเฉลี่ยของโลหะนั้นๆระหว่างปลาหน้าดินและปลาผิวน้ำมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%